

Waldeyer's ring equivalent lymphoid tissue in the rat : a model for studying the immunological role of nose associated lymphoid tissue

Citation for published version (APA):

Koornstra, P. (1997). *Waldeyer's ring equivalent lymphoid tissue in the rat : a model for studying the immunological role of nose associated lymphoid tissue*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19970905pk>

Document status and date:

Published: 01/01/1997

DOI:

[10.26481/dis.19970905pk](https://doi.org/10.26481/dis.19970905pk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

SUMMARY

NALT/WRE could exist. Therefore, lymphocytes of rat lymph nodes, Peyer's patches, NALT/WRE and thoracic duct were isolated, radiolabelled with ^{51}Cr , and next infused into recipient rats in order to monitor their migratory potential *in vivo*. FACS analysis had quantitated that NALT/WRE contained, as found for other mucosa associated lymphoid organs, a preponderance of B over T cells, and in this respect lymphocyte migration patterns for NALT/WRE were expected to resemble those for Peyer's patches. It appeared that lymphocytes of NALT/WRE homed well into all lymphoid organs (e.g. NALT/WRE, lymph nodes, Peyer's patches and spleen). In contrast to lymphocytes from lymph nodes, NALT/WRE lymphocytes homed relatively well into the liver and in this respect were most resembling lymphocytes from Peyer's patches. The T cell migration from NALT/WRE differs, however, from that of Peyer's patches in showing larger migration rate to NALT/WRE and peripheral (e.g. cervical) lymph nodes. Thus in terms of migratory behaviour, NALT/WRE turned out to be rather unique in sharing on one hand characteristics with peripheral node lymphocytes and on the other hand with mucosa associated (Peyer's patch) lymphocytes. These observations could be explained in a variety of fashions including a possible difference in composition in the population of NALT/WRE lymphocytes, or a difference in HEV characteristics of NALT/WRE.

In chapter 5 this issue has been addressed by studying *in vitro* the adherence of lymphocytes to HEV in frozen tissue sections of NALT/WRE and other lymphoid organs. Lymphocyte-populations used for adherence studies were analysed for present subsets using FACS analysis. The populations were then allowed to bind to HEV in frozen tissue sections, and subsequently the lymphocytes bound to HEV were sub-typed by immunofluorescence staining on the sections. The data showed that lymphocyte adherence to the HEV in NALT/WRE is equal to binding to HEV in lymph node, and superior to binding to Peyer's patch HEV. T cells adhere better than B cells to HEV in NALT/WRE, in spite of the fact that NALT/WRE contains more B cells than T cells. Also for CD8 cells it was found that they bound better than CD4 cells, whereas *in situ* many more CD4 than CD8 cells are found in NALT/WRE. Thus the phenotypic lymphocyte subset profile of NALT/WRE does not reflect HEV binding. The T-B cell binding ratio observed for HEV in NALT/WRE is unique since in other lymphoid organs this binding reflected *in situ* composition. For CD4/CD8 binding the noticed discrepancy with *in situ* distribution of CD4 and CD8 cells in NALT/WRE was also found, although less distinct, for the other lymphoid organs. The observation that T cells bind better to NALT/WRE HEV than B cells, possibly regulated by specific adhesion molecules on the HEV, suggests a prevalence of T cell immigration. It may in addition indicate a significant role of T cells and in particular of CD8 cells in the immune function of NALT/WRE.

Summary

In this thesis the development of an experimental rat model for studying the immunological role of oro-nasopharyngeal lymphoid tissue was described. No distinct pharyngeal lymphoid tissue (equivalent to the tonsils of man) was found in the rat, but as described in *chapter 1*, a typical rod-shaped lymphoid organ, was observed bilaterally in the wall of the posterior part of the nose. These two paranasal (nasal) lymphoid organs were, since no other distinct lymphoid tissues were detected in nasopharynx, considered the rat Waldeyer's ring equivalent (WRE), of man, and now are designated nasal associated lymphoid tissue (NALT). The experimental data obtained in this rat NALT/WRE model were presented in the chapters 2 to 5 of this thesis.

In *chapter 2* the systemic and topographic anatomy of these organs were described, as well as the surgical approach to get access to NALT/WRE for short term *in vivo* experiments and for extirpation of the organs *in toto*. It was shown that the blood supply originated from the internal carotid artery and that the lymphatics drained directly into the deep cervical lymph nodes. Light microscopy showed NALT/WRE to be lined by respiratory epithelial cells. This was confirmed by electron microscopic studies, that revealed characteristic "pits" in the epithelial surface, which were identified as fields of distinct so-called M cells. These M cells are held to be responsible for uptake of particulate antigen from the respiratory lumen. Studies with the extirpated organs showed that NALT/WRE grows relatively rapidly in size and weight during the first 8 weeks of life, peaking at 11 weeks. Then, with sexual maturity it declines in size and weight but not to the extent of complete involution or atrophy.

In order to demonstrate that NALT/WRE is indeed mucosa associated lymphoid tissue, in *chapter 3* immunohistochemical studies were carried out to identify lymphoid and non-lymphoid cell types. It was shown that in NALT/WRE the T and B cells were compartmentalised in distinct areas. As in other mucosa associated lymphoid tissues, the B cell areas were located directly underneath the mucosal epithelium and had a preponderance over the T cell areas which were located at the abluminal side in the interfollicular areas. These T cell areas consisted of CD4, CD8 and MHC class II positive dendritic cells, and in addition contained specialized high endothelial venules (HEV). The B cell areas contained follicles with germinal centers in which follicular dendritic cells and scattered CD4 T cells were observed. NALT/WRE also contained plasma cells, notably of the IgA type, located at the abluminal side of the organ. Thus, as studied so far by immunocytochemistry, the NALT/WRE can be considered a typical mucosa associated lymphoid organ.

In *chapter 4* the question was addressed whether NALT/WRE functionally differs or resembles other mucosa associated lymphoid organs such as the Peyer's patches of the small bowel, and if it potentially may influence the systemic immune response. The approach chosen was to study the migratory behaviour of lymphocytes from NALT/WRE to other lymphoid organs and *vice versa*. In NALT/WRE the presence of HEV was demonstrated and, since others have shown that HEV in lymphoid organs express organ-specific adhesion molecules for lymphocytes, it was speculated that organ-specific migration patterns of lymphocytes from and to

SAMENVATTING

Samenvatting

In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van een experimenteel (rat) model ter bestudering van de immunologische rol van oro-nasopharyngeaal lymfoïd weefsel beschreven. In de rat werd geen pharyngeaal lymfoïd weefsel (equivalent aan de humane tonsil) gevonden, maar zoals beschreven in *hoofdstuk 1* werd een staafvormig lymfoïd orgaan bilateraal aan de wand, posterieur in de neus geobserveerd. Aangezien geen ander georganiseerd lymfoïd weefsel in de nasopharynx werd gevonden worden deze twee parachonale (neus) lymfoïde organen beschouwd als het Waldeyers ring equivalent (WRE) van de mens en worden in de literatuur beschreven als neus geassocieerd lymfoïd weefsel (NALT). De experimentele data, verkregen uit dit NALT/WRE onderzoek, worden in de hoofdstukken 2 tot en met 5 van dit proefschrift beschreven.

In *hoofdstuk 2* wordt zowel de anatomie van deze organen beschreven als ook de chirurgische benadering. Met deze chirurgische benadering wordt toegang verkregen tot het NALT/WRE voor zowel kortdurende *in vivo* experimenten als voor het verwijderen van de organen *in toto*. De bloedvoorziening van het NALT/WRE heeft zijn origine in de arteria carotis interna. De afvoerende lymfevaten draineren direct in de diepe cervicale lymfeklieren. Licht microscopie liet zien dat het NALT/WRE bekleed was met respiratoire epitheliale cellen. Dit werd bevestigd door elektronen-microscopische studie. Deze studie liet karakteristieke "pits" in het epitheliale oppervlak zien, welke geïdentificeerd werden als de zo genoemde M cellen. Deze M cellen worden verantwoordelijk gehouden voor de opname van antigeen partikels vanuit het respiratoire lumen. Studie naar het NALT/WRE laat zien dat deze organen relatief snel groeien in afmeting en gewicht gedurende de eerste acht levensweken en hun piek bereiken bij 11 weken. Bij volledige seksuele rijpheid van het dier neemt het NALT/WRE in omvang en gewicht af, maar niet zodanig dat van involutie of atrofie gesproken kan worden.

Om aan te tonen dat NALT/WRE inderdaad mucosa geassocieerd lymfoïd weefsel is, werden in *hoofdstuk 3* immunohistochemische studies uitgevoerd om lymfoïde en niet lymfoïde celtypen te identificeren. Er werd aangetoond dat in het NALT/WRE de T en B cellen gecompartmentaliseerd zijn in verschillende gebieden. Net zoals bij ander mucosa geassocieerd lymfoïd weefsel zijn bij het NALT/WRE de B cel gebieden direct onder het mucosale epitheel gelegen en zijn zij groter in aantal dan de T cel gebieden, welke gelegen zijn aan de niet lumen zijde interfolliculaire gebieden. Deze T cel gebieden bevatten CD4, CD8 en MHC klasse II positieve dendritische cellen. Daarnaast bevatten zij nog gespecialiseerde hoge endotheliale venulen (HEV). De B cel gebieden bevatten follikels met kiemcentra waarin folliculaire dendritische cellen en verspreid liggende CD4 T cellen werden geobserveerd. Het NALT/WRE bevatte ook plasma cellen met name het IgA type. Deze waren gelokaliseerd aan de niet lumen zijde van het orgaan. Deze immunohistochemische studie laat zien dat het NALT/WRE beschouwd kan worden als een mucosa geassocieerd orgaan.

In *hoofdstuk 4* werd de vraag gesteld of het NALT/WRE functioneel verschilt of juist lijkt op andere mucosa geassocieerde organen zoals de plaques van Peyer uit de dunne darm, en of het NALT/WRE invloed heeft op de systemische immuun respons. Om dit te onderzoeken hebben

we gebruik gemaakt van migratie studies van lymphocyten afkomstig uit het NALT/WRE naar ander lymfoïde organen en *vice versa*. In het NALT/WRE was de aanwezigheid van HEV aangetoond. Anderen hebben aangetoond dat HEV in lymfoïde organen orgaan specifieke adhesie moleculen voor lymphocyten tot expressie brengen. Gespeculeerd werd dat er orgaan specifieke migratie patronen van lymphocyten van en naar het NALT/WRE zouden kunnen bestaan. In dat kader werden lymphocyten uit lymfeklieren, plaques van Peyer, NALT/WRE en ductus thoracicus van de rat geïsoleerd. Deze werden radioactief gelabeld met ^{51}Cr en vervolgens ingespoten in acceptor ratten om zo hun migratie potentiaal te monitoren. FACS analyse kwantificeerde in het NALT/WRE meer B dan T cellen. Dit is in overeenstemming met data van FACS analyse bij de andere mucosa geassocieerde lymfoïde organen. Dit wekt de verwachting dat het lymphocyt migratie patroon van het NALT/WRE lijkt op die van de plaques van Peyer. Het bleek dat lymphocyten afkomstig uit het NALT/WRE goed naar lymfoïde organen homen (zoals NALT/WRE, lymfeklieren, plaques van Peyer en milt). In tegenstelling tot lymphocyten afkomstig uit lymfeklieren homen lymphocyten afkomstig uit het NALT/WRE relatief goed naar de lever en lijken hiermee het meest op lymphocyten afkomstig uit de plaques van Peyer. De migratie van T cellen afkomstig uit het NALT/WRE verschilt daarentegen van die van T cellen afkomstig uit plaques van Peyer. T cellen afkomstig uit het NALT/WRE vertonen een hogere mate van migratie naar het NALT/WRE en perifere (b.v. cervicale) lymfeklieren. Met betrekking tot het migratie patroon lijkt het NALT/WRE uniek te zijn; het heeft enerzijds karakteristieken passend bij lymphocyten afkomstig uit perifere lymfeklieren en anderzijds karakteristieken passend bij lymphocyten afkomstig uit mucosa geassocieerde (b.v. plaques van Peyer) lymfoïde organen. Deze observaties kunnen verklaard worden door een verscheidenheid aan mogelijkheden zoals een mogelijk verschil in samenstelling van de populatie van de NALT/WRE lymphocyten, of een verschil in HEV eigenschappen van het NALT/WRE.

In hoofdstuk 5 wordt de binding van lymphocyten door studies van *in vitro* binding van lymphocyten aan HEV's in vriescoupes van het NALT/WRE en andere lymfoïde organen beschreven. Lymphocyten populaties, welke gebruikt werden voor binding studies, werden geanalyseerd op aanwezige lymphocyten subsets door middel van FACS analyse. De populatie lymphocyten werd vervolgens gebonden aan de HEV's van de lymfoïde organen. De gebonden lymphocyten werden gesubtypeerd door immunofluorescentie kleuring op de coupes. De data laten zien dat lymphocyten binding aan de HEV in het NALT/WRE gelijk is aan lymphocyten binding aan HEV in lymfeklieren, maar dat deze beter is dan binding aan HEV van de plaques van Peyer. Ondanks dat het NALT/WRE meer B cellen dan T cellen bevat, hechten T cellen beter dan B cellen aan HEV in het NALT/WRE. Ook voor CD8 positieve cellen werd gevonden dat zij beter binden dan CD4 positieve cellen, ondanks dat *in situ* in het NALT/WRE meer CD4 dan CD8 positieve cellen aanwezig zijn. Het fenotypische lymphocyten profiel van het NALT/WRE reflecteert niet de HEV binding. De T-B cel bindings ratio van HEV in het NALT/WRE is uniek ten opzichte van andere lymfoïde organen omdat de T-B cel bindings ratio niet de *in situ* compositie reflecteert. Met betrekking tot CD4/CD8 binding werd ook een discrepantie gezien tussen binding en de *in situ* distributie bij het NALT/WRE maar voor andere organen minder uitgesproken. De observatie dat T cellen beter aan HEV van het NALT/WRE binden dan B cellen, mogelijk gereguleerd door specifieke adhesie moleculen op de HEV, suggereert een

voorkeur van T cel immigratie. Het kan een significante rol van de T cellen, en in het bijzonder van CD8 cellen betekenen, in de immunologische functie van het NALT/WRE.